

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(43) Дата международной публикации
15 июня 2006 (15.06.2006)

PCT

(10) Номер международной публикации
WO 2006/062427 A1

(51) Международная патентная классификация:
G01N 33/53 (2006.01)

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2004/000464

(22) Дата международной подачи:
24 ноября 2004 (24.11.2004)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(71) Заявители (для всех указанных государств, кроме US): MISSING (INSTITUT MOLEKULARNOI BIOLOGII IM. V.A.ENGELGARDTA ROSSIJSKOI AKADEMII NAUK) [RU/RU]; MISSING MISSING (RU). ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ М. М. ШЕМЯКИНА И Ю. А. ОВЧИННИКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (INSTITUT BIOORGANICHESKOI KHIMII IMENI M.M. SHEMYAKINA I JU.A. OVCHINNIKOVA ROSSIJSKOI AKADEMII NAUK) [RU/RU]; ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, Москва, 117871, Moscow (RU).

(72) Изобретатели; и

(75) Изобретатели/Заявители (только для US): ДЕМЕНТЬЕВА Екатерина Игоревна (DEMENTIEVA, Ekaterina Igorevna) [RU/RU]; ул. Академика Пилотина, д. 26, к. 2, кв. 292, Москва, 117393, Moscow (RU). ДЮКОВА Вероника Игоревна (DJUKOVA, Veronika Igorevna) [RU/RU]; ул. Студенческая, д. 33, к. 3, комната 95, Москва, 121165, Moscow (RU). ЗАСЕДАТЕЛЕВ Александр Сергеевич (ZASEDATELEV, Alexandr Sergeevich) [RU/RU]; ул. Цюрупы, д. 7, к. 2, кв. 17, Москва, 117418, Moscow

(RU). РУБИНА Алла Юрьевна (RUBINA, Alla Yurievna) [RU/RU]; Ленинский пр-т, д. 91, к. 4, кв. 660, Москва, 117313, Moscow (RU). СТОМАХИН Андрей Александрович (STOMAKHIN, Andrei Alexandrovich) [RU/RU]; Севастопольский пр-т, д. 83, к. 1 кв. 120, Москва, 117461, Moscow (RU). НЕСМЕЯНОВ Владимир Андреевич (NESMEYANOV, Vladimir Andreevich) [RU/RU]; ул. Арцимовича, д. 11, кв. 173, Москва, 117437, Moscow (RU). ГРИШИН Евгений Васильевич (GRISHIN, Evgeny Vasilievich) [RU/RU]; 1-ый Боткинский пр-д, д. 6, кв. 150, Москва, 125284, Moscow (RU).

(74) Агент: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "СОЮЗПАТЕНТ" (OBSHCHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTJU "SOJUZPATENT"); ул. Ильинка, д. 5/2, Москва, 103735 Moscow (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL,

[продолжение на следующей странице]

(54) Title: METHOD FOR QUANTITATIVELY DETECTING BIOLOGICAL TOXINS

(54) Название изобретения: СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ

(57) Abstract: The invention relates to analytical chemistry and to quantitative immuno-chemical analysis, in particular to a method for immunochemically quantitatively detecting different biological toxins by using biological microchips. Said biological microchip is embodied in the form of an ordered collection of three-dimensional hydro-helium cells placed on a solid substrate which are produced by a photo-and chemically induced polymerisation method and contain immobilised antibodies to different bacterial, vegetable and animal biotoxins or biotoxins. The use of the microchips makes it possible to analyse a sample simultaneously with respect to several biotoxins. The inventive method for detecting biotoxins can be used for medicine, the food industry and for environment protection.

(57) Реферат: Изобретение относится к области аналитической биохимии и количественному иммунохимическому анализу и касается способа количественного обнаружения различных биологических токсинов иммунохимическим методом с использованием биологических микрочипов. Биологический микрочип представляет собой упорядоченный массив трехмерных гидрогелевых ячеек на твердой подложке, полученных методом фото- или химически индуцированной полимеризации и содержащих иммобилизованные антитела к различным биотоксинам бактериального, растительно и животного происхождения или биотоксины. Применение микрочипов позволяет одновременно анализировать образец на наличие нескольких биотоксинов. Предлагаемый способ обнаружения биотоксинов может быть использован в медицине, в пищевой промышленности, в охране окружающей среды.

WO 2006/062427 A1



PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована:

— с отчётом о международном поиске

В отношении двубуквенных кодов, кодов языков и других сокращений см. "Пояснения к кодам и сокращениям", публикуемые в начале каждого очередного выпуска Бюллетеня PCT.

СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к аналитической биохимии и количественному иммунохимическому анализу и касается количественного обнаружения различных биологических токсинов иммунохимическим методом с использованием трехмерных микрочипов на основе гидрогелей.

Предлагаемый способ обнаружения биотоксинов может быть использован в медицине, в пищевой промышленности, в охране окружающей среды. В настоящее время разработка быстрых и чувствительных методов анализа биологических токсинов приобретает важное значение в связи с угрозой биотерроризма, так как многие природные токсины могут быть использованы в качестве компонентов биологического оружия.

Уровень техники

В настоящее время хорошо известны многие бактериальные, растительные и животные токсины, обладающие сильным токсическим действием на человеческий организм. К наиболее сильным токсинам, продуцируемым микроорганизмами, относятся ботулинический, столбнячный и холерный токсины; из токсинов растительного происхождения наиболее сильными являются рицин и абрин. Существует также множество токсинов, секретируемых ядовитыми животными: змеями, пауками, скорпионами и т.д. Большинство биотоксинов имеют полипептидную природу, однако известны и низкомолекулярные соединения, имеющие высокую токсичность, например, тетродотоксин (иглобрюхие рыбы), Т-2 токсин (грибы), токсины сине-зеленых водорослей.

Для идентификации и анализа как самих токсинов, так и организмов, которые их вырабатывают, в настоящее время используются различные лабораторные методы, включающие тесты на животных, микробиологические методы, анализ ДНК с использованием ПЦР, иммунологические методы: прямой и непрямой радиоиммунологический, иммунофлуоресцентный и иммуноферментный анализ. Наиболее чувствительным, быстрым и удобным методом анализа токсинов является

иммунохимический метод с использованием антител против токсинов. Чувствительность иммуноанализа биотоксинов с использованием классического “плащечного” варианта достигает 0,01-1 нг вещества в 1 мл исследуемого раствора (например, в случае рицина [1], стафилококкового энтеротоксина В [2], дифтерийного токсина [3]).

[1] M.A. Poli, V.R. Rivera, J.F. Hevetson, G.A. Merrill, Detection of ricin by colorimetric and chemiluminescence ELISA, *Toxicon*, 1994, **32**, 1371-1377.

[2] M.A. Poli, V.R. Rivera, D. Neal, Sensitive and specific colorimetric ELISAs for *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B in urine and buffer, *Toxicon*, 2002, **40**, 1723-1726.

[3] K.H. Engler, A. Efstratiou, Rapid enzyme immunoassay for determination of toxigenicity among clinical isolates of corynebacteria, *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **38**, 1385-1389.

Традиционные иммунологические методы не позволяют проводить одновременный тест на наличие нескольких токсинов в образце, поэтому существует необходимость разработки быстрого, чувствительного и эффективного метода одновременного параллельного анализа. Параллельный анализ образцов на присутствие нескольких соединений достигается при использовании микрочипов – массивов индивидуальных ячеек, содержащих различные зонды (белки, рецепторы, антитела, антигены и др.). Проведение одновременного анализа образца по многим параметрам, значительно увеличивает эффективность анализа, позволяет миниатюризировать проведение исследований и значительно снижает количество исследуемого материала.

Описано применение чипов различной конструкции для детекции биологических токсинов. Для одновременного иммунологического определения биологических токсинов предложен чип-биосенсор на основе иммобилизованных антител против биотоксинов [4].

[4] F.S. Ligler, C.R. Taitt, L.C. Shriver-Lake, K.E Sapsford, Y. Shubin, J.P. Golden, Array biosensor for detection of toxins, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **377**, 469-477.

Биочип состоял из двух элементов (блоков). На поверхности предметного стекла располагали каналы с иммобилизованными антителами. Иммобилизация проводилась путем образования комплекса авидин – биотинилированные антитела. Токсины белковой природы анализировали с помощью сэндвич-анализа с

использованием пары соответствующих антител. Растворы антигенов и флуоресцентно-меченных проявляющих антител подавали к иммобилизованным антителам через каналы на втором блоке, ориентированном перпендикулярно колонкам иммобилизованных антител. Флуоресцентные сигналы комплексов антитело-антиген-меченое антитело регистрировали с помощью конфокального микроскопа. Пределы детекции токсинов составили 1,6 нг/мл для холерного токсина, 8 нг/мл для рицина, 40 нг/мл для ботулинического токсина А, 4 нг/мл для стафилококкового энтеротоксина В, $6,2 \cdot 10^4$ КОЕ/мл для бактерий *Bacillus globigii*. Этот биосенсор использовали также для детекции низкомолекулярных токсинов методом конкурентного иммуноанализа.

Для прямого иммуноанализа меченных флуоресцеином стафилококкового и холерного токсинов фирмой Nanogen (США) предложены электронные микрочипы с иммобилизованными антителами [5].

[5] K.L. Ewalt, R.W. Haigis, R. Rooney, D. Ackley, M. Krihak, Detection of biological toxins on an active electronic microchip, *Anal. Biochem.*, 2001, **289**, 162-172.

Иммобилизация биотинилированных антител на микрочипе осуществлялась путем образования комплексов авидин-биотин на микросайтах, содержащих авидин. К микросайтам были подведены электроды, и биотинилированные антитела, а также растворы анализируемых токсинов подавались под действием электрического поля. В этом случае эксперименты по анализу проводили только с токсинами, в которые предварительно была введена флуоресцентная метка.

Фирма Biopragis (США) разрабатывает технологию микрочипов, в которой для детекции сигнала используется Рамановская спектроскопия (комбинационное рассеяние) [6].

[6] A.E. Grow, L.L. Wood, J.L. Claycomb, P.A. Thompson, New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins, *J. Microbiol. Methods*, 2003, **53**, 221-233.

Биомолекулы, в частности, антитела против биотоксинов, иммобилизуют на металлической поверхности в точках диаметром приблизительно 1 микрон. После обработки микрочипа раствором, содержащим анализируемое вещество, происходит образование комплекса антитело-антиген, которое детектируют, получая спектры комбинационного рассеяния, из которых вычитают спектры свободных антител. Показана возможность детекции В (1) и G (1) афлатоксинов из смеси.

Трехмерные микрочипы на основе полиакриламидных гидрогелей впервые были разработаны в ИМБ РАН [7].

[7] G.M. Ershov, A.D. Mirzabekov, Method of manufacturing a matrix for the detection of mismatches, US Patent № 5770721.

В настоящее время гелевые микрочипы получают методами сополимеризации и полимеризационной иммобилизации [8, 9].

[8] А.Д. Мирзабеков, А.Ю. Рубина, С.В. Паньков, Б.К. Чернов Способ иммобилизации олигонуклеотидов, содержащих неопределенные группы, в полимерных гелях при формировании микрочипа. Патент N 2175972, 20 ноября 2001 (Б.И. 2001, N 25).

[9] А.Д. Мирзабеков, А.Ю. Рубина, С.В. Паньков Способ полимеризационной иммобилизации биологических макромолекул и композиция для его осуществления, Патент РФ N 2216547.

Технология получения гидрогелевых микрочипов включает подготовку подложки (стекло, пластик, кремний) (1), нанесение полимеризационной смеси, содержащей компоненты геля и иммобилизуемые вещества, в виде капель на подложку с помощью робота (2), фотоиндуцированную полимеризацию геля с образованием гелевых элементов, содержащих иммобилизованные зонды (3). В результате получают массивы дискретных гелевых элементов, каждый из которых содержит иммобилизованный зонд. В качестве зондов могут выступать олигонуклеотиды, ДНК, белки, различные низкомолекулярные соединения [10-12]. Показано, что белковые микрочипы, полученные методом сополимеризации, можно использовать для исследования белок-белковых взаимодействий, в частности, взаимодействий антиген-антитело, проведения иммунохимических и ферментативных реакций [11, 12].

[10] A.Yu. Rubina, S.V. Pan'kov, E.I. Dementieva, D.N. Pen'kov, A.V. Butygin, V.A. Vasiliskov, A.V. Chudinov, A.L. Mikheikin, V.M. Mikhailovich, A.D. Mirzabekov, Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production, *Anal. Biochem.*, 2004, **325**, 92-106.

[11] А.Ю. Рубина, С.В. Паньков, С.М. Иванов, Е.И. Дементьева, А.Д. Мирзабеков, Белковые микрочипы, Докл. Акад. Наук, 2001, **381**, 701-704.

[12] A.Yu. Rubina, E.I. Dementieva, A.A. Stomakhin, E.L. Darii, S.V. Pan'kov, V.E. Barsky, S.M. Ivanov, E.V. Konovalova, A.D. Mirzabekov, Hydrogel-based protein

microchips: manufacturing, properties, and applications, *BioTechniques*, 2003, **34**, 1008-1022.

В предлагаемом изобретении микрочипы на основе трехмерных гидрогелей использованы для разработки способа количественного обнаружения биологических токсинов.

Недостатки

Недостатком традиционных иммунологических методов анализа является невозможность проводить одновременный анализ нескольких соединений, в частности, биотоксинов, в образце. Множественный параллельный анализ нескольких соединений достигается при использовании микрочипов.

К недостаткам описанных в литературе способов анализа биологических токсинов на микрочипах относятся сложная технология изготовления микрочипов: объединение нескольких блоков, подведение каналов для подачи растворов, присоединение электродов. Регистрация сигналов производится с использованием сложной и дорогостоящей аппаратуры: конфокальный микроскоп, Рамановская спектроскопия и др. Эти недостатки преодолены при разработке способа иммуноанализа биологических токсинов с использованием трехмерных микрочипов на основе гидрогелей.

Раскрытие изобретения

Целью изобретения является разработка способа количественного обнаружения биологических токсинов бактериального, растительного и животного происхождения, позволяющего проводить одновременный параллельный анализ нескольких биотоксинов в образце с чувствительностью, не уступающей или превышающей чувствительность стандартных иммунологических тестов. Поставленная цель достигается путем разработки способа количественного обнаружения биологических токсинов с использованием микрочипов на основе гидрогелей. Гидрогелевые элементы диаметром 100-600 мкм и высотой 30-100 мкм, содержащие иммобилизованные антитела против биотоксинов или биотоксины, получены методом фото- или химически индуцированной полимеризации и ковалентно закреплены на поверхности подложки (стекло, пластик или кремний). Предлагаемый способ включает следующие стадии:

- а) изготовление биологического микрочипа, представляющего собой упорядоченный массив трехмерных гидрогелевых ячеек на твердой подложке, содержащих иммобилизованные антитела к различным биотоксинам или биотоксины, причем в каждой отдельной ячейке иммобилизовано антитело к индивидуальному биотоксину или индивидуальный биотоксин;
- б) инкубацию микрочипа в реакционной среде, включающей образец, содержащий подлежащие анализу биотоксины, для образования иммунных комплексов биотоксин-антитело, которую при необходимости проводят в условиях перемешивания;
- в) детекцию образовавшегося комплекса;
- г) количественное обнаружение анализируемого биотоксина.

При нанесении на микрочип реакционной среды, содержащей анализируемый образец (биотоксин), происходит образование иммунных комплексов со специфическими лигандами, иммобилизованными в гелевых ячейках микрочипа. Детекцию образовавшегося комплекса на стадии в) и последующее количественное обнаружение на стадии г) проводят в формате прямого, конкурентного или сэндвич-иммуноанализа.

Для прямого иммуноанализа реакционная среда на стадии б) содержит анализируемый биотоксин, который образует специфический комплекс с иммобилизованными на чипе антителами против этого токсина.

Конкурентный анализ проводят с использованием микрочипа с иммобилизованными биотоксинами или иммобилизованными антителами. В первом случае реакционная среда на стадии б) дополнительно содержит меченые антитела к анализируемому биотоксину, и происходит конкуренция меченых антител за связывание с биотоксином в растворе и биотоксином, иммобилизованным на микрочипе. В другом варианте конкурентного анализа микрочип содержит иммобилизованные антитела, а реакционная среда на стадии б) дополнительно содержит меченый биотоксин. Происходит конкуренция между меченым и немеченым биотоксином за связывание с иммобилизованными антителами.

В случае сэндвич-иммуноанализа микрочип содержит иммобилизованные антитела, реакционная среда на стадии б) содержит анализируемый биотоксин, который образует специфический комплекс с иммобилизованными на чипе

антителами. После образования комплекса микрочип проявляют мечеными антителами, специфичными к другому эпитопу данного биотоксина.

При необходимости стадию *б)* проводят в условиях перемешивания, которое значительно уменьшает время проведения анализа.

Способы прямого и конкурентного анализа возможны как для токсинов белковой природы, так и для низкомолекулярных токсинов. Сэндвич-вариант иммуноанализа возможен только для биотоксинов белковой природы, для которых можно получить антитела, специфичные к разным эпитопам белковой молекулы.

Регистрацию результатов иммуноанализа проводят с помощью флуоресценции, хемилюминесценции либо масс-спектрометрии непосредственно с гелевых элементов микрочипа. Антитела или биотоксины могут содержать флуоресцентные метки или являться конъюгатами с белками или другими соединениями, способными участвовать в реакциях, приводящих к излучению света (хеми- или биолуминесценции). Для масс-спектральной детекции не требуется введения дополнительных меток.

Количественное обнаружение биотоксина осуществляют путем проведения стадий *а) - в)* со стандартными (эталонными) образцами, содержащими известные концентрации анализируемого биотоксина. Строится калибровочная зависимость “сигнал гелевой ячейки микрочипа – концентрация биотоксина”. После этого стадии *а) - в)* проводят с анализируемым образцом, и по калибровочной зависимости определяют концентрацию анализируемого биотоксина в образце.

Предлагаемый способ позволяет проводить одновременный параллельный анализ нескольких биотоксинов в образце. Микрочип для параллельного множественного анализа содержит иммобилизованные антитела против нескольких токсинов и/или несколько иммобилизованных биотоксинов. В каждой отдельной гелевой ячейке иммобилизовано антитело к индивидуальному биотоксину или индивидуальный биотоксин. После инкубации микрочипа в реакционной среде, включающей образец, содержащий несколько подлежащих анализу биотоксинов, образуются специфические иммунные комплексы биотоксин-антитело. В случае прямого иммуноанализа реакционная среда содержит образец, включающий несколько анализируемых токсинов, и после инкубации микрочипа с образцом регистрируют сигналы ячеек микрочипа, содержащих соответствующее иммобилизованное антитело. Для конкурентного анализа реакционная среда на

стадии б) дополнительно содержит смесь меченых антител ко всем анализируемым биотоксинам или смесь всех анализируемых меченых биотоксинов. В случае сэндвич-иммуноанализа проявление микрочипа после инкубации в реакционной среде, включающей образец, осуществляют смесью меченых антител против всех анализируемых биотоксинов.

Чувствительность предлагаемого способа обнаружения биологических токсинов не уступает чувствительности плащечного варианта иммуноанализа, например, предел обнаружения рицина сэндвич-иммуноанализом с использованием гелевых микрочипов составил 0,1 нг/мл (Таблица 1).

Предлагаемый способ анализа биотоксинов, основанный на использовании гелевых микрочипов имеет ряд существенных преимуществ перед микрочипами, описанными в литературе: развитая трехмерная гелевая структура обладает гораздо большей емкостью для иммобилизации по сравнению с двумерными микрочипами, что намного увеличивает чувствительность анализа; кроме того, иммобилизованные белки находятся в гидрофильном окружении, и отсутствует контакт с гидрофобной поверхностью подложки, что способствует сохранению биологической активности иммобилизованных молекул и обеспечивает высокую стабильность при хранении.

Краткое описание фигур

Предлагаемое изобретение иллюстрируется следующими фигурами, на которых:

Фигура 1 демонстрирует результаты иммуноанализа рицина на микрочипах.

- А. Прямой иммуноанализ. Микрочипы содержали гелевые элементы с иммобилизованными антителами против рицина Rch1, 0,1 мг/мл. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации рицина, меченого Cy3 , в растворе.
- Б. Конкурентный анализ. Микрочипы содержали гелевые элементы с иммобилизованным рицином, 0,05 мг/мл. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации рицина в растворе после инкубации рицина с раствором Cy3 -меченных антител 1RK2, 4 мкг/мл.
- В. Сэндвич-анализ с флуоресцентной регистрацией. Микрочипы содержали гелевые элементы с иммобилизованными антителами против рицина Rch1, 0,1 мг/мл; микрочипы после инкубации с растворами рицина проявляли антителами против рицина 1RK1, мечеными Cy3 , 20 мкг/мл. Зависимость интенсивности

флуоресценции от концентрации рицина в растворе. Врезка на Фиг. 1В показывает флуоресцентные сигналы при низких концентрациях рицина. Пунктирная линия соответствует интенсивности флуоресценции в 3 раза выше, чем разброс фонового сигнала; предел обнаружения рицина составил 0,1 нг/мл.

Г. Сэндвич-анализ с хемилюминесцентной регистрацией. Микрочипы содержали гелевые элементы с иммобилизованными антителами против рицина 1RK2, 0,1 мг/мл; микрочипы после инкубации с растворами рицина проявляли биотинилированными антителами против рицина 2RK1 (40 мкг/мл), конъюгатом авидин-пероксидаза (45 мкг/мл) и хемилюминесцентными субстратами пероксидазы. Зависимость интенсивности хемилюминесценции от концентрации рицина в растворе.

Каждая точка на графиках является средним из четырех параллельных измерений.

Фигура 2 демонстрирует MALDI-TOF масс-спектры стафилококкового энтеротоксина В, полученные с гелевых ячеек микрочипа с иммобилизованными моноклональными антителами против этого токсина S222, 0,1 мг/мл, после инкубации микрочипа с раствором токсина. Концентрации биотоксина в растворе 100 (А), 10 (Б) и 1 (В) мкг/мл.

Фигура 3 представляет результаты одновременного анализа нескольких биотоксинов на одном микрочипе. Микрочипы содержали гелевые элементы с иммобилизованными моноклональными антителами против стафилококкового токсина (S222), дифтерийного токсина (7D9), столбнячного токсина (3D2C6), летального фактора сибиреязвенного токсина (10EDG7), рицина (1RK1) и вискумина (TAS). Каждое антитело было иммобилизовано в 4-х гелевых элементах в концентрации 0,1 мг/мл. Флуоресцентные изображения получены после инкубации микрочипа с раствором стафилококкового токсина (чип 1), дифтерийного токсина (чип 2), столбнячного токсина (чип 3), летального фактора сибиреязвенного токсина (чип 4), рицина (чип 5) и вискумина (чип 6) и проявления смесью СуЗ-меченных моноклональных антител против всех 6 исследуемых биотоксинов (антитела против стафилококкового энтеротоксина В S643, антитела против дифтерийного токсина 2A3, антитела против столбнячного токсина 3D10B11, антитела против летального фактора сибиреязвенного токсина 3B4D9, антитела против рицина Rch1, антитела против вискумина MNA9). Концентрация биотоксинов в растворе 50 нг/мл (для

каждого из токсинов), концентрация каждого проявляющего антитела в смеси 20 мкг/мл, общая концентрация меченых антител в смеси 120 мкг/мл.

Осуществление изобретения

Гидрогелевые микрочипы для количественного обнаружения биологических токсинов изготавливаются методом фото- или химически индуцируемой радикальной полимеризации по запатентованной технологии [9]. Микрочип представляет собой упорядоченный массив трехмерных гидрогелевых ячеек на твердой подложке, содержащих иммобилизованные антитела к различным биотоксинам бактериального, растительного и животного происхождения или иммобилизованные биотоксины различной природы. В каждой отдельной ячейке микрочипа иммобилизован индивидуальный лиганд. Связывание лиганда с гидрогелевой матрицей возможно как напрямую при его иммобилизации в процессе формирования геля, так и через образование специфических комплексов авидин (стрептавидин) – биотин, например, иммобилизованный авидин – биотинилированное антитело, или иммобилизованная нитрилотриуксусная кислота – рекомбинантный белок, содержащий полигистидиновый фрагмент и др.

В качестве лигандов используются антитела различных типов, все типы иммуноглобулинов (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), моноклональные антитела, поликлональные антитела, рекомбинантные антитела, различные типы мини антител, в том числе Fab-фрагменты и одноцепочечные антитела (scFv и другие), а также низкомолекулярные биотоксины и биотоксины белковой природы. Лигандами для образования специфического комплекса с анализируемыми биотоксинами могут являться также аптамеры – молекулы ДНК или РНК, способные к высокоаффинному взаимодействию с соответствующим соединением. Например, получен РНК-аптамер, состоящий из 31 нуклеотида, специфичный к А-цепи рицина [13] и ДНК-аптамеры, специфичные к холерному токсину и стафилококковому энтеротоксину В [14].

[13] J.R. Hesselberth, D. Miller, J. Robertus, A.D. Ellington, In vitro selection of RNA molecules that inhibit the activity of ricin A-chain, *J. Biol Chem.*, 2000, **275**, 4937-4942

[14] J.G. Bruno, J.L. Kiel, Use of magnetic beads in selection and detection of biotoxin aptamers by electrochemiluminescence and enzymatic methods, *Biotechniques*, 2002, **32**, 178-183.

Используемый для изготовления микрочипов метод полимеризационной иммобилизации позволяет получать микрочипы, содержащие иммобилизованные ДНК, РНК и белки [9-12].

Тип используемых для иммобилизации соединений зависит от анализируемого объекта и способа проведения анализа (прямой, конкурентный, сэндвич-анализ и др.).

Способ проведения количественного обнаружения биотоксинов с использованием гидрогелевых микрочипов включает следующие стадии:

- а)* изготовление биологического микрочипа, представляющего собой упорядоченный массив трехмерных гидрогелевых ячеек на твердой подложке, полученных методом фото- или химически индуцированной полимеризации и содержащих иммобилизованные антитела к различным биотоксинам бактериального, растительного и животного происхождения или биотоксины, причем в каждой отдельной ячейке иммобилизовано антитело к индивидуальному биотоксину или индивидуальный биотоксин;
- б)* инкубацию микрочипа в реакционной среде, включающей образец, содержащий подлежащие анализу биотоксины, для образования иммунных комплексов биотоксин-антитело, которое при необходимости проводят в условиях перемешивания;
- в)* детекцию образовавшегося комплекса;
- г)* количественное обнаружение анализируемого биотоксина.

В качестве реакционной среды при проведении анализа используют буферные растворы, которые обычно применяются в иммуноанализе, например, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,2, содержащий 0,15 М NaCl, 0,05 М трис-HCl, pH 7,4, и др. Для уменьшения неспецифических взаимодействий в реакционную среду добавляют поливиниловый спирт, бычий сывороточный альбумин и сахарозу, белки сухого молока и др. (так называемые “блокировочные буферы”, которые хорошо известны специалистам в данной области)

Способ количественного обнаружения биотоксинов может быть осуществлен в виде различных типов иммуноанализа, например, прямого, конкурентного и сэндвич-иммуноанализа (Пример 1). Для прямого иммуноанализа микрочип содержит иммобилизованные антитела против анализируемого биотоксина, а реакционная среда на стадии *б)* содержит анализируемый биотоксин, который

образует специфический иммунный комплекс с иммобилизованными антителами. При флуоресцентной регистрации анализируемый биотоксин содержит флуоресцентную метку, при хемилюминесцентной регистрации биотоксин представляет собой конъюгат с белком или другим соединением, способным участвовать в реакциях, приводящих к излучению света (хеми- или биолуминесценции). Регистрируемый флуоресцентный или хемилюминесцентный сигнал ячеек микрочипа с иммобилизованными антителами пропорционален концентрации биотоксина (Пример 1, Фиг. 1А). Способы введения флуоресцентной метки или получения конъюгатов с белком или другим соединением хорошо известны в данной области. В частности, можно использовать процедуры, описанные в G.T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996. В случае масс-спектральной детекции не требуется введения дополнительной метки.

Конкурентный анализ проводят с использованием микрочипа с иммобилизованными биотоксинами или иммобилизованными антителами. В первом варианте реакционная среда на стадии б) дополнительно содержит флуоресцентно-меченные антитела к анализируемому биотоксину (или соответствующие конъюгаты антител). Реакционную смесь перед нанесением на микрочип инкубируют со стандартным или анализируемым образцом. При инкубации микрочипа с реакционной смесью происходит конкуренция меченых антител за связывание с биотоксином в растворе и биотоксином, иммобилизованным на микрочипе. Регистрируемый флуоресцентный или хемилюминесцентный сигнал ячеек микрочипа с иммобилизованными биотоксинами тем выше, чем меньше концентрация анализируемого токсина в образце (Пример 1, Фиг. 1Б)

В другом варианте конкурентного анализа микрочип содержит иммобилизованные антитела, а реакционная среда на стадии б) дополнительно содержит флуоресцентно-меченный биотоксин (или соответствующий конъюгат биотоксина). Происходит конкуренция между меченым и немеченым биотоксином за связывание с иммобилизованными антителами. Регистрируемый флуоресцентный или хемилюминесцентный сигнал ячеек микрочипа с иммобилизованными антителами тем выше, чем меньше концентрация анализируемого токсина в образце.

В случае сэндвич-иммуноанализа микрочип содержит иммобилизованные антитела, реакционная среда на стадии б) содержит анализируемый биотоксин,

который образует специфический комплекс с иммобилизованными на чипе антителами. После образования комплекса микрочип проявляют флуоресцентно-меченными антителами (или соответствующими конъюгатами антител), специфичными к другому эпитопу данного биотоксина. Регистрируемый флуоресцентный или хемилюминесцентный сигнал ячеек микрочипа с иммобилизованными антителами пропорционален концентрации биотоксина (Пример 1, Фиг. 1В,Г).

Прямой и конкурентный анализы на микрочипах можно проводить для токсинов как белковой природы, так и для низкомолекулярных токсинов. Сэндвич-вариант иммуноанализа возможен, как правило, только для биотоксинов белковой природы, для которых можно получить антитела, специфичные к разным эпитопам белковой молекулы (иммобилизованные связывающие антитела и проявляющие меченые антитела).

Количественное обнаружение биотоксинов осуществляют путем проведения стадий *а)-в)* с известными концентрациями анализируемого биотоксина и построения калибровочной зависимости, по которой определяют количество анализируемого биотоксина в образце. Для всех вариантов анализа строят калибровочный график зависимости интенсивности флуоресцентного или хемилюминесцентного сигнала соответствующих гелевых ячеек микрочипа от известной концентраций биотоксина в стандартном (эталонном) растворе. Неизвестную концентрацию биотоксина в образце определяют из калибровочной кривой по значению интенсивности сигнала, полученного после взаимодействия анализируемого образца с микрочипом. Предел обнаружения биотоксина определяют как концентрацию, соответствующую интенсивности флуоресцентного/хемилюминесцентного сигнала, в 3 раза превышающего разброс фонового сигнала.

Регистрацию результатов иммуноанализа биотоксинов с использованием гелевых микрочипов можно проводить несколькими методами: по интенсивности флуоресценции; по интенсивности хемилюминесценции; масс-спектрометрией непосредственно с гелевых элементов микрочипа.

При регистрации результатов по интенсивности флуоресценции используют антитела против биотоксинов и биотоксины, меченные флуоресцентными красителями, например, такими как Техасский красный, тетраметилродамин,

флуоресцеин, цианиновый 3 и 5 (Cy3, Cy5), но, не ограничиваясь ими. Регистрацию флуоресцентных сигналов с ячеек микрочипа проводят с помощью флуоресцентных микроскопов или сканирующих микроскопов различных типов, позволяющих регистрировать сигнал с используемой флуоресцентной метки.

При регистрации результатов по интенсивности хемилюминесценции используют конъюгаты антител, биотоксинов или авидина (для биотинилированных белков), например, с такими ферментами, как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, люцифераза, но не ограничиваясь ими, дающими хемилюминесцентные сигналы в результате соответствующих ферментативных реакций, например, катализируемом пероксидазой окислении люминола перекисью водорода. Хемилюминесцентные сигналы регистрируют с помощью CCD-камер или других регистрирующих устройств, в частности, флуоресцентных микроскопов при выключенном источнике возбуждающего света.

Для регистрации результатов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии разработана методика получения MALDI TOF масс-спектров непосредственно с гелевых ячеек микрочипа. Процедура регистрации результатов анализа в этом случае включает обработку микрочипа раствором, разрушающим комплекс, образованный исследуемым биотоксином с иммобилизованным на чипе антителом против этого токсина (элюирование биотоксина с ячейки микрочипа), прямой масс-спектральный анализ непосредственно с гелевого элемента, и идентификацию биотоксина по его молекулярной массе (Пример 2, Фиг. 2).

Пример 3 показывает результаты иммуноанализа 6 различных биологических токсинов на гидрогелевых микрочипах. Способ количественного обнаружения биотоксинов с использованием гидрогелевых микрочипов характеризуется высокой чувствительностью, не уступающей чувствительности стандартных иммунологических методов: для рицина предел обнаружения составил 0,1 нг/мл.

Предлагаемый способ количественного обнаружения биотоксинов с использованием гидрогелевых микрочипов позволяет проводить одновременный, параллельный анализ образцов на наличие нескольких токсинов, что резко увеличивает эффективность обнаружения и значительно снижает количество исследуемого материала: для анализа достаточно 20 мкл исследуемого образца. Микрочип для параллельного множественного анализа содержит иммобилизованные антитела против нескольких токсинов и/или несколько иммобилизованных

биотоксинов. В случае прямого иммуноанализа реакционная среда содержит образец, включающий один или несколько анализируемых токсинов, и после инкубации микрочипа с образцом регистрируют сигналы ячеек микрочипа, содержащих соответствующие иммобилизованные антитела. Для конкурентного анализа реакционная среда на стадии б) дополнительно содержит смесь меченых антител ко всем анализируемым биотоксинам или смесь всех анализируемых меченых биотоксинов. В случае сэндвич-иммуноанализа проявление микрочипа после инкубации в реакционной среде, содержащей образец, осуществляют смесью меченых антител против всех анализируемых биотоксинов. В Примере 4 продемонстрировано проведение одновременного сэндвич-анализа 6 различных биологических токсинов на одном микрочипе при проявлении микрочипа смесью 6 флуоресцентно-меченных антител. Чувствительность параллельного анализа оказалась не меньше, чем чувствительность для определения одного токсина.

При необходимости стадию инкубации микрочипа в реакционной среде, включающей образец, содержащий подлежащие анализу биотоксины (стадия б) проводят в условиях перемешивания, которое значительно уменьшает время проведения анализа (Пример 5). Перемешивание можно осуществлять, например, путем переключения направления потока реакционного раствора с прямого на обратное с помощью насосов различного типа, ультразвуком, электрофорезом, но, не ограничиваясь указанными способами.

Преимуществом гидрогелевых микрочипов по сравнению с описанными в литературе двумерными чипами является гидрофильное окружение иммобилизованных в геле молекул и отсутствие контакта с гидрофобной поверхностью подложки, что особенно важно для белковых молекул. Гидрофильное окружение способствует сохранению биологической активности белков и ферментов и обеспечивает их стабилизацию при хранении. Микрочипы с иммобилизованными антителами стабильны, по крайней мере, в течение полугода при хранении в присутствии глицерина при 10°C (Пример 6).

Далее изобретение иллюстрируется конкретными воплощениями, которые приводятся исключительно для целей наглядности. Не предполагается, что приводимые примеры являются исчерпывающими или ограничивают изобретение конкретными раскрытыми формами, и очевидно, что возможно множество

модификаций и вариаций, не отклоняющихся от духа изобретения и не выходящие за рамки формулы изобретения.

Пример 1. Количественный иммуноанализ рицина с использованием гидрогелевых микрочипов

Гидрогелевые микрочипы, содержащие иммобилизованные антитела против рицина и рицин, получали по ранее запатентованной технологии полимеризационной иммобилизации [9]. Для уменьшения неспецифических взаимодействий во всех вариантах анализа микрочипы предварительно инкубировали в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,15 М NaCl, 1 % поливинилового спирта (ПВС-50) или 3 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 4 % сахарозы (“блокировочный буфер”), 2 ч при комн. температуре. Перед проведением анализа растворы рицина (образца) разбавляли 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,2, содержащим 0,15 М NaCl, 0,15 % ПВС-50 и 0,15 % поливинилпирролидона 360 (ПВП-360).

Прямой иммуноанализ К микрочипам, содержащим гелевые элементы с иммобилизованными моноклональными антителами против рицина Rch1 и других биотоксинов (антитела против стафилококкового энтеротоксина В S222, антитела против столбнячного токсина 3D2C6, антитела против дифтерийного токсина 7D9, для контроля перекрестных взаимодействий (концентрация иммобилизованных в геле антител 0,1 мг/мл), добавляли по 20 мкл растворов рицина, меченного Cu^{32} , и выдерживали при 10°C в течение ночи. После отмывки микрочипов 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,2, 0,15 М NaCl, 0,1 % Твин-20 (15 мин, комн. температура) измеряли интенсивность флуоресцентных сигналов гелевых элементов микрочипов.

Для конкурентного анализа использовали микрочип с иммобилизованным рицином (0,1 мг/мл). Раствор, содержащий определяемый рицин, инкубировали с раствором Cu^{32} -меченных моноклональных антител против рицина 1RK2 (4 мкг/мл) в течение 2-х ч при 37°C и перемешивании. Смесь (20 мкл) после инкубации наносили на микрочип и выдерживали 2 час при 37°. После отмывки (0,01 М фосфатный буфер, pH 7,2, 0,15 М NaCl, 0,1 % Твин-20, 15 мин, комн. температура) измеряли интенсивность флуоресцентных сигналов.

В сэндвич-варианте иммуноанализа изготавливали микрочипы с иммобилизованными моноклональными антителами против рицина 1RK2 и других биотоксинов (антитела против стафилококкового энтеротоксина В S222, антитела против столбнячного токсина 3D2C6, антитела против дифтерийного токсина 7D9, для контроля перекрестных взаимодействий (концентрация иммобилизованных в геле антител 0,1 мг/мл), добавляли 20 мкл раствора рицина, и чипы инкубировали при 10°C в течение ночи. После кратковременной (15 мин) отмывки 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,2, 0,15 М NaCl, 0,1 % Твин-20, микрочипы проявляли СуЗ-мечеными антителами 1RK1, специфичными к другому эпитопу антигена, 20 мкг/мл (флуоресцентная детекция), 40 мин, комн. температура. После отмывки (0,01 М фосфатный буфер, pH 7,2, 0,15 М NaCl, 0,1 % Твин-20, 15 мин, комн. температура) измеряли интенсивность флуоресцентных сигналов. При хемилюминесцентной детекции на микрочип после взаимодействия с рицином наносили 20 мкл биотинилированных антител против рицина 2RK1 с концентрацией 40 мкг/мл, а затем 20 мкл конъюгата авидина с пероксидазой хрена с концентрацией 45 мкг/мл и хемилюминесцентные субстраты пероксидазы (люминол, H₂O₂); детектировали хемилюминесцентный сигнал в течение 60 сек.

Антитела против рицина и рицин, меченные СуЗ, а также биотинилированные антитела и конъюгат авидин-пероксидаза получали по известным методикам, описанным, например, в [15].

[15] G.T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996.

Для измерения флуоресцентных сигналов использовали флуоресцентный микроскоп, снабженный CCD камерой и компьютерными программами для визуализации изображения и обработки полученных данных, разработанный в лаборатории биочипов ИМБ РАН [16].

[16] V. Barsky, A. Perov, S. Tokalov, A. Chudinov, E. Kreindlin, A. Sharonov, E. Kotova, A. Mirzabekov, Fluorescence data analysis on gel-based biochips, *J. Biomol. Screening*, 2002, 7, 247-257.

Микроскоп позволяет одновременно анализировать данные со всех элементов микрочипа и получать двумерное и трехмерное изображения флуоресцентного сигнала с гелевых элементов. Для измерения хемилюминесцентных сигналов использовали тот же флуоресцентный микроскоп с выключенным источником возбуждения.

Для всех вариантов анализа строили график зависимости интенсивности флуоресценции или хемилюминесценции от концентрации рицина в растворе (Фиг. 1) Предел обнаружения рицина рассчитывали как концентрацию, соответствующую интенсивности сигнала, в 3 раза превышающего разброс фонового сигнала.

Для прямого анализа рицина наблюдали зависимость интенсивности флуоресценции гелевых ячеек микрочипа от концентрации Cu^{3+} -меченного рицина в диапазоне концентраций 0,2-500 нг/мл, линейная зависимость наблюдалась в диапазоне концентраций 0,2-60 нг/мл (Фиг. 1А), предел обнаружения составил 0,2 нг/мл.

В случае конкурентного анализа интенсивность флуоресценции гелевых ячеек микрочипа была обратно пропорциональна концентрации рицина в растворе (Фиг. 1Б), и предел обнаружения составил 4 нг/мл.

Калибровочные графики для сэндвич-анализа рицина с флуоресцентной и хемилюминесцентной детекцией показаны на Фиг. 1 В и Г. Зависимость интенсивности флуоресценции и хемилюминесценции гелевых ячеек микрочипа от концентрации рицина наблюдали в диапазоне концентраций рицина 0,1-500 нг/мл (флуоресцентная детекция) и 0,7-500 нг/мл (хемилюминесцентная детекция). Врезка на Фиг. 1В иллюстрирует определение предела детекции: пунктирная линия соответствует интенсивности флуоресценции, в три раза превышающей разброс фонового сигнала, таким образом, наименьшая концентрация рицина, надежно определяемая данным методом, составляет 0,1 нг/мл. Для иммуноферментного анализа рицина на микрочипе с хемилюминесцентной детекцией предел обнаружения был 0,7 нг/мл.

При данных условиях проведения анализа, в частности, при используемых нами процедурах блокировки и отмывки микрочипов, неспецифические сигналы, т.е., сигналы от ячеек микрочипа, содержащих антитела к другим токсинам, не отличались от фоновых или от сигналов пустых гелевых элементов.

Пример 2. Идентификация белков на гелевом элементе микрочипа путем прямого масс-спектрального анализа. Прямой анализ стафилококкового энтеротоксина В на микрочипе с масс-спектральной регистрацией

Изготовлен микрочип, содержащий в гелевых ячейках иммобилизованные моноклональные антитела к стафилококковому энтеротоксину В S222 (0,1 мкг антител/ячейка геля). После полимеризации микрочип промывали 0,01 М фосфатным буфером, содержащим 0,15 М NaCl, 0,1 % Твин-20, при перемешивании в течение 1 час (20°C). Микрочип инкубировали с раствором стафилококкового энтеротоксина в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,15 М NaCl (20 час, 20°C), и далее отмывали от неспецифически связавшегося с гелем белка сначала обработкой 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,2, содержащем 0,15 М NaCl, 0,1 % Твин-20 (2 часа при перемешивании, 20°C), затем водой. Перед проведением масс-спектрального анализа разрушали комплекс антиген-антитело и элюировали антиген на поверхность геля добавлением в каждую ячейку микрочипа 1 мкл насыщенного раствора матрицы для MALDI мониторинга (синапиновая кислота) в растворе 10% муравьиной кислоты в 30%-ном водном ацетонитриле. Микрочип выдерживали 20 мин при комнатной температуре во влажной камере, затем высушивали на нагревательном столике при 40°C.

Масс-спектры, полученные непосредственно с гелевых элементов микрочипа, после взаимодействия с растворами стафилококкового токсина различной концентрации, показаны на Фиг. 2. Стафилококковый энтеротоксин В идентифицировали по его молекулярной массе, равной 28400 Да. Как видно из рисунка, наблюдается количественная корреляция между абсолютной интенсивностью пиков молекулярных ионов и концентрацией энтеротоксина в интервале концентраций 1-100 мкг/мл. Масс спектры с гелевых ячеек, не содержащих антитела к этому токсину, но инкубированных с раствором антигена, не содержали вышеупомянутых пиков.

Пример 3. Количественный иммуноанализ различных биологических токсинов с использованием гидрогелевых микрочипов

Результаты количественного иммуноанализа различных биологических токсинов на гелевых микрочипах, полученных методом полимеризационной иммобилизации, показаны в Таблице 1. Кроме иммуноанализа рицина, описанного в Примере 1, был проведен анализ вискумина, стафилококкового энтеротоксина В, столбнячного токсина, дифтерийного токсина и летального фактора сибиреязвенного токсина. Прямой, конкурентный и сэндвич-иммуноанализ с

флуоресцентной и хемилюминесцентной регистрацией проводили по методикам, описанным в Примере 1, с использованием антител, указанных в Таблице 1. В таблице 1 также указан интервал концентраций, при которой наблюдали зависимость интенсивности флуоресцентного или хемилюминесцентного сигнала гелевых ячеек микрочипа от концентрации биотоксина; нижний предел интервала соответствует пределу обнаружения, рассчитанному как описано в Примере 1.

Пример 4. Одновременный анализ нескольких биотоксинов на одном микрочипе Основное преимущество микрочипов перед традиционными методами иммуноанализа – это возможность количественного анализа образцов одновременно на наличие нескольких антигенов. Получены микрочипы с гелевыми элементами, содержащими иммобилизованные антитела к 6 биотоксинам (рицин, вискумин, стафилококковый энтеротоксин В, столбнячный токсин, дифтерийный токсин, летальный фактор сибиреязвенного токсина). После инкубации микрочипа с раствором, содержащим один из исследуемых токсинов, микрочип проявляли смесью СуЗ-меченных вторичных антител против всех 6 токсинов (Фиг. 3). Пары антител для параллельного анализа нескольких токсинов подбирали таким образом, чтобы неспецифическое взаимодействие с другими токсинами и антителами было минимальным. Например, в случае параллельного анализа антитела против рицина 1RK1 использовали в качестве иммобилизованных, а антитела Rch1 – в качестве проявляющих, а не наоборот, как в Примере 1 для сэндвич-анализа, так как иммобилизованные антитела Rch1 давали неспецифические сигналы с СуЗ-мечеными антителами против стафилококкового энтеротоксина В SEB 643. Наблюдали яркие флуоресцентные сигналы в гелевых элементах, содержащих соответствующие антитела. Пределы обнаружения биотоксинов для параллельного анализа оказались такие же, как и при определении каждого токсина в отдельности (Таблица 1).

Пример 5. Ускорение иммуноанализа биотоксина при использовании перемешивания анализируемого образца

Сэндвич-иммуноанализ рицина проводили как описано в Примере 1, но микрочипы инкубировали с растворами рицина в течение 1 час при перемешивании. Перемешивание осуществляли с помощью перистальтического насоса. Для этого

микрочип помещали в проточную камеру объемом 50 мкл, снабженную трубками для подачи образца. Камеру присоединяли к перистальтическому насосу, и в систему помещали 100 мкл раствора рицина. Образец перемешивали, переключая направление потока с прямого направления на обратное каждые 2 сек; скорость потока была 1,5 мл/мин. Одновременно проводили анализ с перемешиванием на 6 микрочипах, т.е. измерение 6 образцов с различными концентрациями рицина. После инкубации микрочипы проявляли СуЗ-мечеными вторичными антителами против рицина. Калибровочный график для определения рицина методом сэндвич-иммуноанализа с перемешиванием в течение 1 час был аналогичен калибровочному графику при проведении сэндвич-анализа с инкубацией в течение ночи без перемешивания (Фиг. 1В). Таким образом, осуществление перемешивания образца позволило существенно сократить время иммуноанализа с использованием микрочипов.

Пример 6. Стабильность гидрогелевых микрочипов с иммобилизованными антителами

Были изготовлены микрочипы с иммобилизованными антителами против рицина, как описано в Примере 1. Микрочипы хранили при 10°C во влажной камере в присутствии 20% глицерина. Проводили сэндвич-анализ рицина с флуоресцентной регистрацией, строили калибровочную кривую “интенсивность флуоресцентного сигнала – концентрация рицина в растворе” и определяли предел обнаружения рицина, как описано в Примере 1. Предел обнаружения рицина на микрочипах после 6 мес. хранения оказался 0,1 нг/мл, т.е. такой же, как для микрочипов непосредственно после изготовления. Таким образом, микрочипы с иммобилизованными антителами полностью сохраняют свою активность в течение, по крайней мере, 6 мес. хранения.

Таблица 1. Результаты количественного иммуноанализа различных биотоксинов на микрочипе

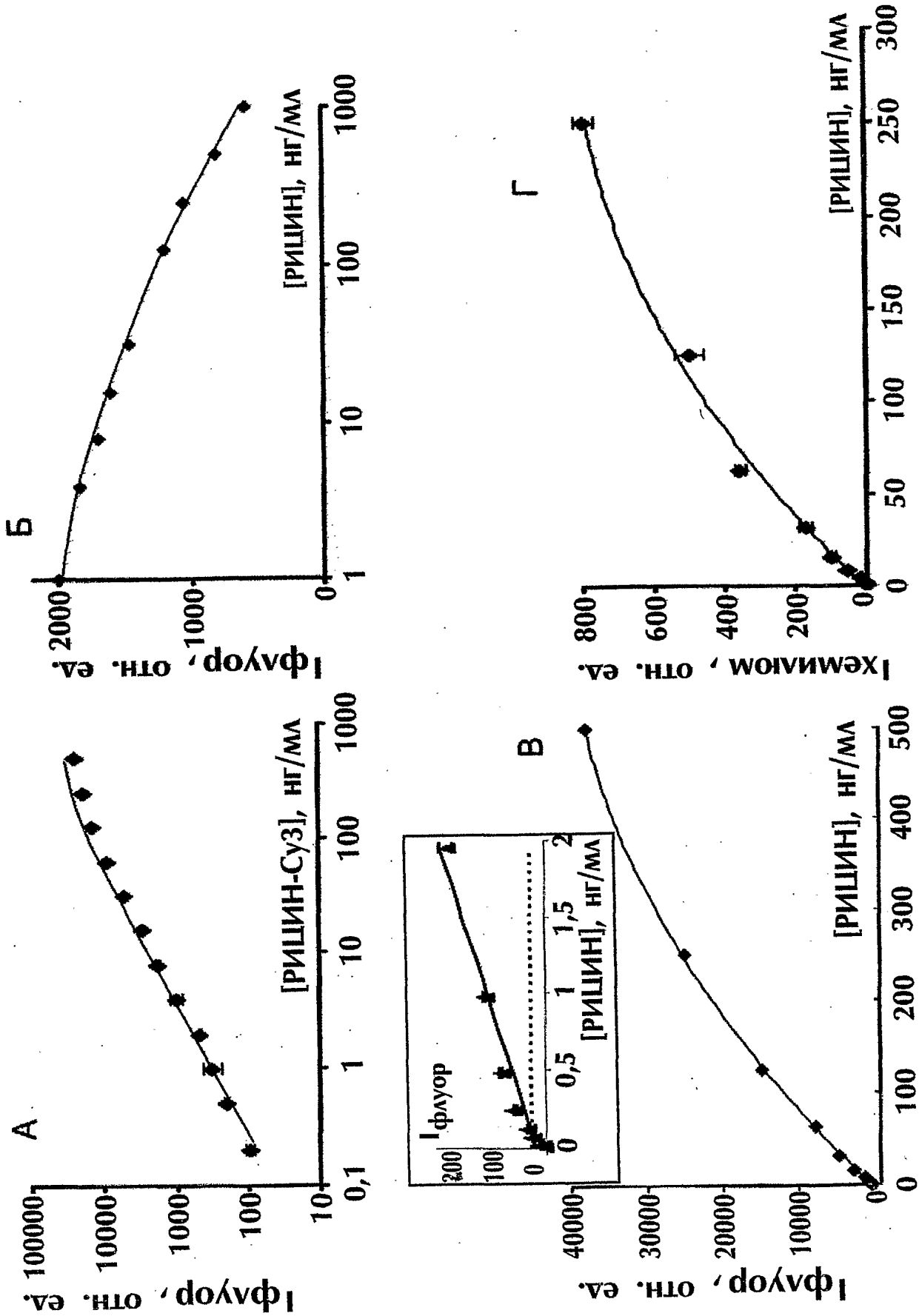
Биотоксин	Тип анализа (регистрация сигнала)	Антитела	Интервал концентраций для анализа на микрочипах, нг/мл	Предел обнаружения для стандартных тест- систем, нг/мл
Рицин	Прямой анализ (флуоресценция)	Rch1 (иммобилизованные)	0,2–500	0,1
	Конкурентный анализ (флуоресценция)	1RK2-Cy3	4–1000	
	Сэндвич-анализ (флуоресценция)	Rch1 (иммобилизованные), 1RK1-Cy3 (проявляющие)	0,1–500	
	Сэндвич-анализ (хемилюминесценция)	1RK2 (иммобилизованные), 2RK1-биотин + авидин-ПХ (проявляющие)	0,7–500	
Вискумин	Сэндвич-анализ (флуоресценция)	TAS (иммобилизованные), MNA9-Cy3 (проявляющие)	2–1000	0,08 – 5,0
Стафилокок- ковый энтеротоксин В	Прямой анализ (флуоресценция)	S222 (иммобилизованные)	50–20000	0,01 – 1,0
	Сэндвич-анализ (флуоресценция)	S222 (иммобилизованные), S643-Cy3 (проявляющие)	1–300	
Столбнячный токсин	Сэндвич-анализ (флуоресценция)	3D2C6 (иммобилизованные), 3D10B11-Cy3 (проявляющие)	10–1000	100

Дифтерийный токсин	Прямой анализ (флуоресценция)	2A3 (иммобилизованные)	12-25000	0,1 – 5,0
	Сэндвич-анализ (флуоресценция)	4C7 (иммобилизованные), 2A3-Cy3 (проявляющие)	1-500	
Летальный фактор сибирезвеноного токсина	Прямой анализ (флуоресценция)	8D5B11 (иммобилизованные)	20-20000	500
	Сэндвич-анализ (флуоресценция)	10EDG7 (иммобилизованные), 3B4D9-Cy3 (проявляющие)	4-4000	
	Сэндвич-анализ (хемилюминесценция)	10EDG7 (иммобилизованные), 3B4D9-биотин + авидин-ПХ (проявляющие)	6-1000	

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

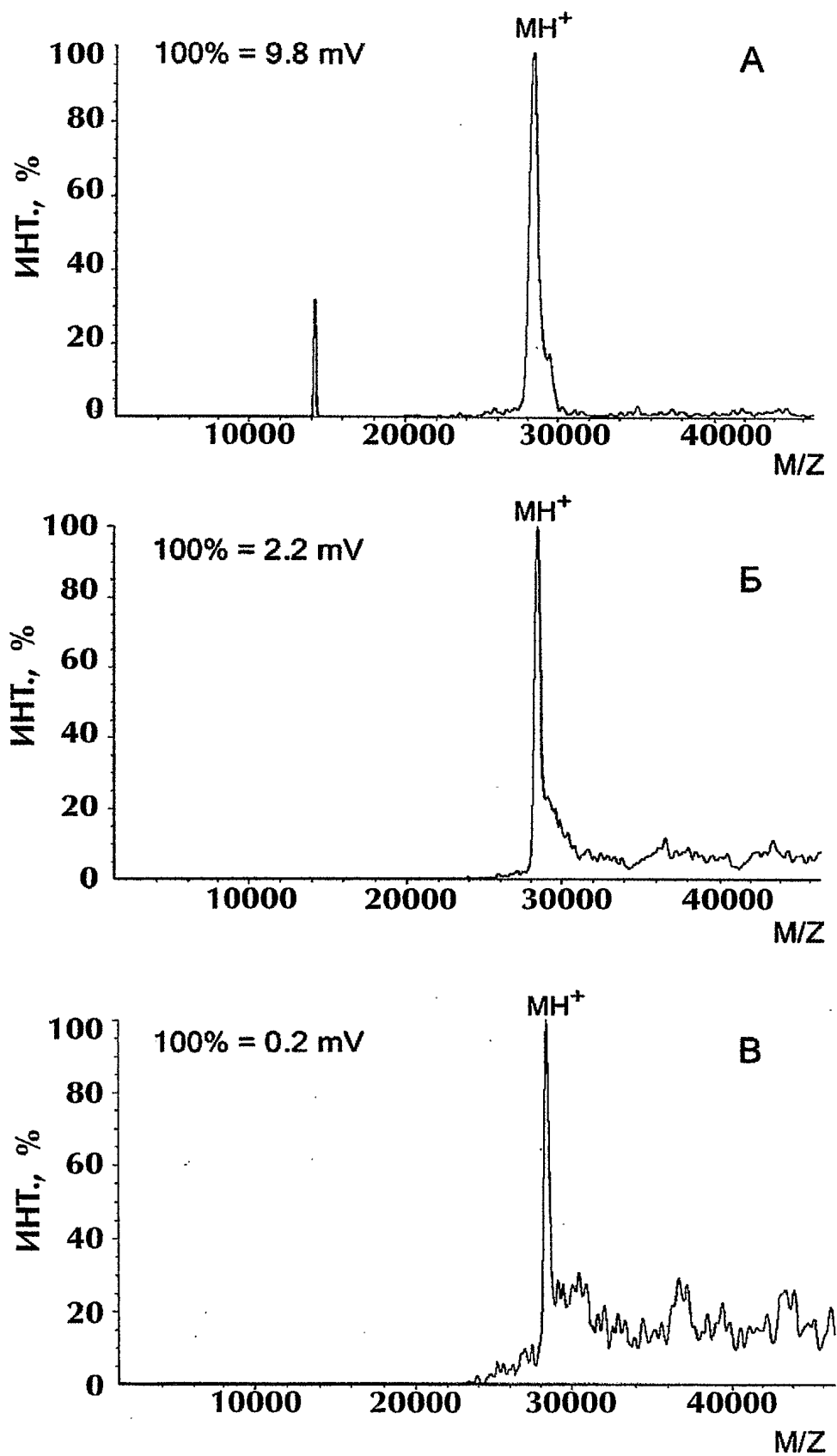
1. Способ количественного обнаружения биотоксинов в образце, предусматривающий:
 - а) изготовление биологического микрочипа, представляющего собой упорядоченный массив трехмерных гидрогелевых ячеек на твердой подложке, полученных методом фото- или химически индуцированной полимеризации и содержащих иммобилизованные антитела к различным биотоксинам бактериального, растительного и животного происхождения или биотоксины, причем в каждой отдельной ячейке иммобилизовано антитело к индивидуальному биотоксину или индивидуальный биотоксин;
 - б) инкубацию микрочипа в реакционной среде, включающей образец, содержащий подлежащие анализу биотоксины, для образования иммунных комплексов биотоксин-антитело, которую при необходимости проводят в условиях перемешивания;
 - в) детекцию образовавшегося комплекса;
 - г) количественное обнаружение анализируемого биотоксина.
2. Способ по п. 1, в котором иммобилизованные антитела представляют собой антитела, выбранные из группы антител к рицину, вискумину, стафилококковому энтеротоксину В, столбнячному токсину, дифтерийному токсину, летальному фактору сибиреязвенного токсина.
3. Способ по п. 1, в котором иммобилизованные биотоксины представляют собой биотоксины, выбранные из группы, включающей рицин, вискумин, стафилококковый энтеротоксин В, столбнячный токсин, дифтерийный токсин, летальный фактор сибиреязвенного токсина.
4. Способ по п. 1, в котором детекцию образовавшегося комплекса на стадии в) и последующее количественное обнаружение на стадии г) проводят в формате прямого иммуноанализа.
5. Способ по п. 1, в котором реакционная среда на стадии б) дополнительно содержит антитела к биотоксину, и детекцию образовавшегося комплекса между иммобилизованным на микрочипе биотоксином и антителом против этого биотоксина на стадии в) и последующее количественное обнаружение на стадии г) проводят в формате конкурентного иммуноанализа.

6. Способ по п. 1, в котором реакционная среда на стадии б) дополнительно содержит меченый биотоксин, и детекцию образовавшегося комплекса между иммобилизованным на микрочипе антителом и биотоксином на стадии в) и последующее количественное обнаружение на стадии г) проводят в формате конкурентного иммуноанализа.
7. Способ по п. 1, в котором детекцию образовавшегося комплекса на стадии в) и последующее количественное обнаружение на стадии г) проводят в формате сэндвич-иммуноанализа.
8. Способ по п. 1, в котором количественное обнаружение биотоксина осуществляют путем проведения стадий а) - в) с известными концентрациями анализируемого биотоксина и построения калибровочной зависимости, по которой определяют количество анализируемого биотоксина в образце.
9. Способ по п. 1, в котором на стадии в) детекцию образовавшегося комплекса осуществляют флуориметрически, хемилюминетрически или масс-спектрометрически.



ФИГ. 1

2/3



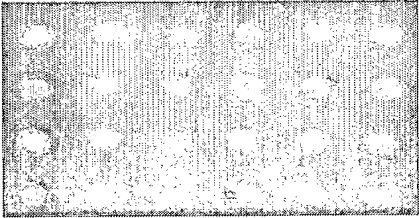
ФИГ. 2

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

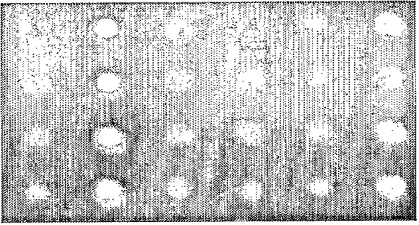
ИММОБИЛИ-
ЗОВАННЫЕ
АНТИТЕЛА
ПРОТИВ:

СТАФИЛ. ТОКСИН
ДИФТЕРИЙНЫЙ
ТОКСИН
СТОЛБНЯЧНЫЙ
ТОКСИН
ЛЕТАЛЬНЫЙ
ФАКТОР
РИЦИН
ВИСКУМИН

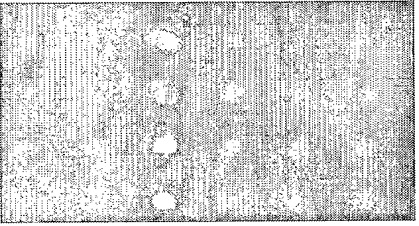
СТАФИЛ.
ТОКСИН
(1)



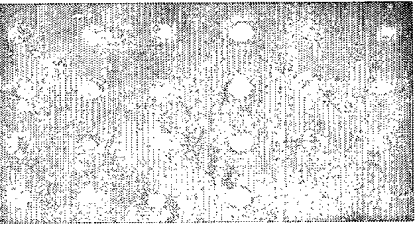
ДИФТЕРИЙНЫЙ
ТОКСИН
(2)



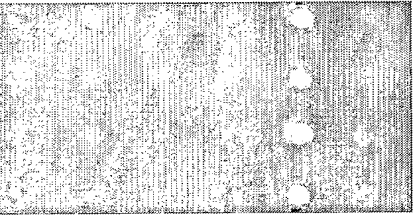
СТОЛБНЯЧНЫЙ
ТОКСИН
(3)



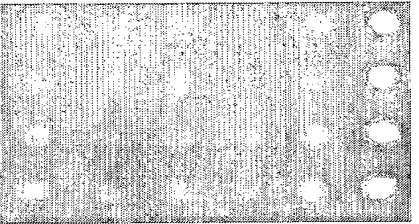
ЛЕТАЛЬНЫЙ
ФАКТОР
(4)



РИЦИН
(5)



ВИСКУМИН
(6)



ФИГ. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2004/000464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <div style="text-align: right; margin-right: 100px;">G01N 33/53</div>				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">G01N 33/53, 33/50, 33/48</div>				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	RU 2216547 C2 (INSTITUT MOLEKULYARNOI BIOLOGII im. V.A.ENGELGARDA RAN), 20.11.2003, the claims	1-9		
Y	RUBINA A.Yu. et al. Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. BioTechniques, 2003, May; 34(5), p. 1008-1022	1-9		
Y	LIGLER F.S. et al. Array biosensor for detection of toxins. Anal Bioanal Chem., 2003, Oct;377(3), p. 469-477. Epub 2003 Jun 13, the abstract	2-3, 5-6		
A	RUBINA A.Yu. et al. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. Analytical biochemistry, 2004, 325, p. 92-106	1-9		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">12 June 2005 (12.06.2005)</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">21 June 2005 (21.06.2005)</div>		
Name and mailing address of the ISA/ Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2004/000464

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 8075742 A (JAPAN MENBURGEN TECHNOL KK et al.) 22.03.1996, the abstract	1-9

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2004/000464

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

G01N 33/53

Согласно Международной патентной классификации (МПК-7)

В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-7:
G01N 33/53, 33/50, 33/48

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, поисковые термины):

С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	RU 2216547 C2 (ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ им В.А. ЭНГЕЛЬГАРДТА РАН) 20.11.2003, формула	1-9
Y	RUBINA A.Yu. et al. Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. BioTechniques, 2003, May; 34(5), p. 1008-1022	1-9
Y	LIGLER F.S. et al. Array biosensor for detection of toxins. Anal Bioanal Chem., 2003, Oct;377(3), p. 469-477. Epub 2003 Jun 13, реферат	2-3, 5-6
A	RUBINA A.Yu. et al. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. Analytical biochemistry, 2004, 325, p. 92-106	1-9

☒ последующие документы указаны в продолжении графы С.

☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

- А документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным
- Е более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее
- Л документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)
- О документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.
- Р документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета

- Т более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение
- Х документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности
- Y документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста
- & документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска:
12 июля 2005 (12.07.2005)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске:
21 июля 2005 (21.07.2005)

Наименование и адрес Международного поискового органа
Федеральный институт промышленной собственности
РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб.,
30,1 Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо:

О. Глушенкова

Телефон № 240-25-91

Форма PCT/ISA/210 (второй лист)(апрель 2005)

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2004/000464

С. (продолжение) ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
А	JP 8075742 A (JAPAN MENBURGEN TECHNOL KK et al.) 22.03.1996, реферат	1-9